

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-087491

(43)Date of publication of application : 07.04.1998

(51)Int.Cl.

A61K 31/47

A61K 31/495

A61K 31/55

// C07D217/02

C07D401/12

C07D401/12

(21)Application number : 08-269115

(71)Applicant : ASAHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 20.09.1996

(72)Inventor : OKAMOTO TAKASHI
KANEKAWA AKITAKA
SATO TSUNEO
MORIKAWA YASURI

(30)Priority

Priority number : 08214135 Priority date : 26.07.1996 Priority country : JP

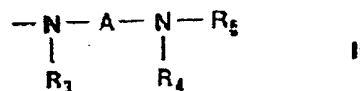
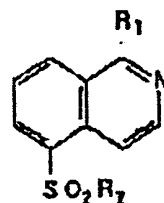
(54) TRANSCRIPTION CONTROL FACTOR INHIBITOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject medicinal agent containing an isoquinoline having a specific structure as active ingredient, inhibiting NF- κ B, and useful for preventing/treating such diseases as to be caused by inflammatory cytokine's abnormal production or the increased manifestation of inflammatory cell adhesion molecules.

SOLUTION: This medicinal agent contains, as effective component, a substituted isoquinoline derivative (an acid-added salt thereof) of formula I [R₁ is H, Cl, etc.; when R₁ is H, R₂ is a group from a compound of formula II (A is a 2-4C alkyl either nonsubstituted or substituted by a 1-4C alkyl for an H atom bound to a carbon atom; R₃ and R₄ are each H, etc.; R₅ is H, etc.)], e.g. 1-(isoquinolinesulfonyl)-4-aminopiperidine. The compound of formula I is obtained, for example, by reaction between 5-isoquinolinesulfonic acid chloride and homopiperazine.

This medicinal agent is used as a preventive/therapeutic agent for e.g. chronic arthrorheumatism, an immunosuppressive agent to be used in organ transplantation, an antiviral agent, etc.



LEGAL STATUS

BEST AVAILABLE COPY

[Date of request for examination] 22.07.2003
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-87491

(43) 公開日 平成10年(1998) 4月7日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
A 6 1 K 31/47	A E D	A 6 1 K 31/47 A E D
31/495	A B E	31/495 A B E
31/55	A B G	31/55 A B G
// C 0 7 D 217/02		C 0 7 D 217/02
401/12	2 1 1	401/12 2 1 1

審査請求 未請求 請求項の数 7 F D (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-269115
(22) 出願日 平成8年(1996) 9月20日
(31) 優先権主張番号 特願平8-214135
(32) 優先日 平8(1996) 7月26日
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000000033
旭化成工業株式会社
大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
(72) 発明者 岡本 尚
愛知県名古屋市長区松栄町2-76-2
メゾンファミール2A
(72) 発明者 金川 章孝
静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業
株式会社内
(72) 発明者 佐藤 恒雄
静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業
株式会社内
(74) 代理人 弁理士 清水 猛 (外2名)
最終頁に続く

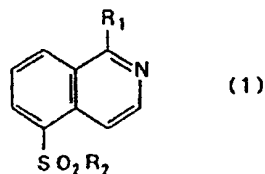
(54) 【発明の名称】 転写調節因子阻害剤

(57) 【要約】

【課題】 NF-k B 磷酸化酵素阻害作用に基づく転写調節因子 NF-k B の活性化の阻害剤、すなわち、NF-k B を阻害することによる、炎症性サイトカインの産生異常や細胞接着分子の発現増加によって引き起こされる疾患などの予防治療剤を提供することである。

【解決手段】 次の一般式 (1)

【化1】

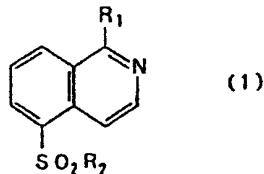


で示される置換されたイソキノリン誘導体またはその酸付加塩を有効成分とする NF-k B 磷酸化酵素阻害剤、NF-k B 活性化抑制剤、炎症性サイトカイン産生抑制剤、炎症性細胞接着分子発現抑制剤、および慢性関節リウマチ予防治療剤。

【特許請求の範囲】

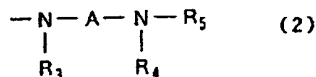
【請求項1】 下記一般式(1)

【化1】



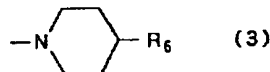
〔式中、R₁は水素、塩素または水酸基を表し、R₂が水素のとき、R₂は式(2)

【化2】



〔式中、Aは無置換もしくは炭素に結合する水素が炭素数1ないし4個のアルキル基で置換されている炭素数2ないし4個のアルキレン基、R₃、R₄は互いに独立して水素または炭素数1ないし4個の直鎖または枝分かれを有するアルキル基、R₅は水素、炭素数1ないし6個からなる直鎖または枝分かれを有するアルキル基、アミノ基、カルバモイル基、シクロヘキシル基、あるいはR₃、R₄は直接結合して無置換もしくは炭素数1ないし4個のアルキル基で置換されている炭素数4個以下のアルキレン基、あるいはR₃、R₄は直接結合し隣接する窒素原子とともに複素環を形成する基を表す。〕で示される化合物、または式(3)

【化3】



〔式中、R₆は水酸基またはアミノ基を表す。〕で示される化合物を表し、R₆が塩素または水酸基のとき、R₆は式(2)で示される化合物のうち、Aはエチレン基、R₃、R₄は互いに結合したトリメチレン基、R₅は水素原子の場合を表す。〕で示される置換されたイソキノリン誘導体またはその酸付加塩を有効成分とするNF-kB磷酸化酵素阻害剤。

【請求項2】 一般式(1)のR₁が水素のときのR₁が、式(2)において、Aは無置換の炭素数2ないし4個のアルキレン基、R₃は水素、R₄は水素またはメチル基、R₅は水素、メチル基、アミノ基、カルバモイル基またはシクロヘキシル基、あるいはR₃、R₄は直接結合して無置換のエチレン基、あるいはR₃、R₄は直接結合し隣接する窒素原子とともに6員環複素飽和単環を形成する基を表す場合の化合物である請求項1に記載のNF-kB磷酸化酵素阻害剤。

【請求項3】 請求項1に記載の一般式(1)で示される置換されたイソキノリン誘導体またはその酸付加塩を有効成分とするNF-kB活性化抑制剤。

【請求項4】 請求項1に記載の一般式(1)で示される置換されたイソキノリン誘導体またはその酸付加塩を有効成分とする炎症性サイトカイン産生抑制剤。

【請求項5】 請求項1に記載の一般式(1)で示される置換されたイソキノリン誘導体またはその酸付加塩を有効成分とする炎症性細胞接着分子発現抑制剤。

【請求項6】 請求項1に記載の一般式(1)で示される置換されたイソキノリン誘導体またはその酸付加塩を有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤。

【請求項7】 一般式(1)で示される化合物のうち下記に示す化合物またはその酸付加塩。

1-(5-イソキノリンスルホニル)-4-アミノピペリジン

1-(5-イソキノリンスルホニル)-4-ヒドロキシピペリジン

1-カルバモイル-4-(5-イソキノリンスルホニル)ホモピペラジン

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、NF-kB磷酸化酵素阻害剤作用に基づく転写調節因子NF-kBの活性化の阻害剤、すなわち、NF-kBを阻害することによる、炎症性サイトカインの産生異常や炎症性細胞接着分子の発現増加によって引き起こされる疾患等の予防治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】生体が順応できない刺激(起炎症刺激)に遭遇した時、障害された組織から種々の反応媒介物質が産生され、炎症が惹起される。中でも、IL-1、IL-6、IL-8等のインターロイキン類やTNF(腫瘍壊死因子)等の炎症性サイトカイン、およびICAM-1、ICAM-2、VCAM-1、VCAM-2、ELAM等の炎症性細胞接着分子は、自己免疫疾患を始めとする免疫異常に起因する種々の疾患において、関わっていることが明らかになってきている。

【0003】例えば、慢性関節リウマチ(RA)患者の関節液中のIL-6濃度が局所の炎症所見と相関する

(Hirano, et al., Eur. J. Immunol., 18, 1797, (1988); Di Giovine, F.S.ら Rheumatol. Int., 9: 259, (1990); Rooney, M.ら Rheumatol. Int., 10: 217, (1990))、血清中のIL-6濃度が全身的なRA疾患活動性と相関する(Eastgate, J.A.ら Lancet, 8613: 706, (1988))、IL-8が関節炎、乾癬、喘息、敗血症等の多くの炎症性疾患で産生異常が認められている(岡本秀一、臨床免疫、27(Suppl.16): 80-85, (1995))、また、慢性関節リウマチ(RA)患者の罹患関節においては、滑膜細胞、組織マクロファージ、血管内皮細胞などにICAM-1の強い発現が見られている(Hale, P.L.ら Arthritis Rheum., 32: 22-30, (1989))。さらに、ICAM-1、E-selectin等、炎症反応に深く関与している細胞接着

分子に関しては、中和抗体で機能を抑制することにより炎症症状が改善すること、臓器移植時の拒絶反応の制御にも使えることが明らかになってきている〔特開平6-209778;細胞工学 別冊 接着分子ハンドブック 秀潤社:p139-144,p229-234, (1994); Isobe, M. ら Science, 255: 1125-1127 (1992)〕。

【0004】炎症のごく早期段階でIL-1、TNFなどの炎症性サイトカインが炎症部位より産生され〔Baumann, H. ら Immunol. Today, 15: 74-80, (1994)〕、IL-1、TNFにより血管内皮細胞上に炎症性細胞接着分子のICAM-1、VCAM-1、ELAM-1等の産生が増強され、炎症細胞が炎症部位に浸潤する〔Shimizu, Y. ら Immunol. Today, 13: 106-112, (1992)〕。同時に炎症部位より産生されるIL-8等の走化性因子によって、好中球やT細胞が炎症部位に浸潤する〔Matushima, K. ら Cytokine, 1: 2-13, (1989)〕。さらに、単球系の細胞を始めとする浸潤細胞によって、IL-6の産生が亢進し症状を増悪する〔Van Snick, J. ら Annu. Rev. Immunol., 8: 235-278 (1990)〕等のことが明らかにされてきている。

【0005】これまで多くの抗炎症剤が使用されているが、種々の炎症性サイトカインの産生、または炎症性細胞接着分子の発現を抑制するものとしては、いまだに有効なものとは出現していない。NSAID（非ステロイド抗炎症剤）類は、アラキドン酸代謝においてシクロオキシゲナーゼを阻害することにより、プロスタグランジンの産生を抑制するのみで、直接サイトカインの産生は阻害しない。ステロイド類は、複数のサイトカインの産生を抑制はするが、ホルモン性の副作用が大きい。また、サイトカイン抗体あるいはIL-1受容体アンタゴニストの類は、特定のサイトカインの活性を抑制するが、複数のサイトカインの機能を直接抑制することはできない。ICAM-1に対する抗体も、臓器移植時の拒絶反応抑制などで効果が報告されているが、抗体であるので特異性が高く、ICAM-1の作用は抑制するが、他の接着分子や、ましてサイトカインの産生には直接の作用はない。

【0006】最近、IL-6、IL-8等の炎症性サイトカインや炎症性細胞接着分子の遺伝子解析が進み、これらが共通の転写調節因子で制御されていることが明らかになってきた〔Shimizu, H. ら Mol. Cell. Biol., 10: 561-568, (1990); Zhang, Y. ら Mol. Cell. Biol., 10: 3818-3823, (1990); Liebermann, T. ら Mol. Cell. Biol., 10: 2327-2334, (1990); Kunsch, C. ら Mol. Cell. Biol., 13: 6137-6146, (1993)〕。この転写調節因子が、ヌクレオファクターカッパービー（NF-kB）と呼ばれている蛋白質である〔Sen, R. ら Cell 46: 705-716 (1986); Baeuerle, P.A. ら Genes Dev. 3: 1689-1698 (1989); Lenardo, M.J. ら Cell 58: 227-229 (1989)〕。一般的に、転写調節因子は遺伝子上流側に存在するプロモーターあるいはエンハンサー部分に結合する蛋白質で、複

数の因子によって下流の遺伝子の転写を調節している。

【0007】NF-kBは、1986年にSenらにより同定された蛋白質で〔Sen, R. ら Cell 46: 705-716 (1986)〕、p50とp65の2つのサブユニットからなり、IL-2受容体 α 鎖、T細胞受容体 β 等の受容体、IFN β 、IL-2、IL-6、IL-8、GM-CSF、G-CSF、TNF α 、リンホトキシン等のサイトカインの発現誘導を担っていることが明らかになってきている〔細胞増殖の制御南江堂:p161-175 (1993)〕。さらに、NF-kBは、ICAM-1〔Voraberger, G. ら Immunol. 147: 2777-2786 (1991)〕、ELAM-1〔Whelan, J. ら Nucleic Acids Res. 19: 2645-2653 (1991)〕等、炎症反応に深く関与している細胞接着分子の発現にも関与している。

【0008】ところで、本発明者らが先の出願（特願平7-125128）で記載したように、NF-kBはエイズウイルス（HIV）、成人T細胞白血病細胞の原因ウイルス（HTLV-1）、サイトメガロウイルス（CMV）等の宿主内増殖にも関与していることが明らかになってきた〔Lenardo, M.J. ら Cell 58: 227-229 (1989); 藤沢順一ら、実験医学, 11: 1073-1079, (1993); Sambucetti, L.C. ら EMBO J., 8: 4251-4258 (1989); Kowalik, T.F. ら Proc Natl Acad Sci USA, 90: 1107-1111, (1993); Boldoch, I. ら Biochem Biophys Res Commun 197: 1505-1510 (1993)〕。すなわち、HIV、HTLV-1は感染後、ヒト細胞内においてヒトのNF-kBを使用して、自らの遺伝子増殖を行っているのである。

【0009】HIVが自己を複製する際には、HIV遺伝子の中にあるエンハンサーと呼ばれる、転写を活性化（増強）する配列が重要な働きを行う。このHIVエンハンサー中にはNF-kB結合配列が存在し、HIVエンハンサーの転写増強にはNF-kBの活性化が極めて重要であることも知られている〔Bielinska A, Nabel GJ ら、Science 259: 997-1000, 1990〕。

【0010】現在エイズの発症メカニズムとしては、HIVの盛んな増殖がエイズ発症の最大の要因であることが示唆されており〔Pantaleo, G. ら Nature 362: 355-358 (1993); Embretson, J. ら Nature 362: 359-362 (1993)〕、HIVの増殖を抑制する治療薬の開発が進められている。AZT等の逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤等が試みられているが、強い毒性の出現や耐性株の出現等〔Larder B.A., Science 243, 1731, (1989); Concorde Coordinating Committee, Lancet 343, 871, (1993)〕でまだ有効な治療薬は見出されていないのが現状である。したがって、この転写調節因子NF-kBの機能を阻害する化合物は、上記のウイルスの遺伝子発現を抑制することができ、優れた抗ウイルス剤となり得ると期待される。

【0011】また、NF-kBは、TNF、IL-1等により活性化された免疫系細胞、間質系細胞または内皮

-2707 (1995)]。この NF- κ B を磷酸化する酵素 (以下、NF- κ B 磷酸化酵素と呼ぶ) により NF- κ B が磷酸化を受けると、DNA に結合するようになることも確認されている [Hayashi, T., 他 J. Biol. Chem. 268: 26790-26795 (1993); Naumann, M., 他 EMBO J. 13: 4597-4607 (1994)]。

10 【0016】NF-kBを磷酸化する酵素としてNF-kB磷酸化酵素が知られている〔Hayashi, T., ち J. Biol. Chem. 268: 26790-26795 (1993)〕。本酵素は、大量培養したヒト末梢血リンパ球の細胞質画分から精製される、ATPとの結合反応後のゲル電気泳動から推定される分子量が43 kDaの蛋白リン酸化酵素であり、NF-kBのサブユニットp50とp65、両方のセリン残基を磷酸化しNF-kBを活性化するものである。NF-kB磷酸化酵素をATPと共に30℃でインキュベートすると、NF-kBがDNAと結合できるようになることがEMSA (Electrophoresis Mobility Shift Assay) の実験結果から示されている。

【0017】本酵素を抑制する阻害剤が得られれば、NF- κ Bを介した疾患に対する治療が可能になると考えられる。すなわち、複数の炎症性サイトカイン遺伝子の転写を抑制し、炎症性サイトカインの異常産生を抑制する医薬品、また、細胞接着を介した炎症等に対する炎症剤や癌転移抑制剤、臓器移植の際に用いる免疫抑制剤、さらに、抗ウイルス予防治療剤としての臨床応用が考えられる。

【0018】既に転写調節因子阻害剤としては特開平7-291859号公報、特開平7-291860号公報があるが、上記発明で用いられている化合物は、ユビキノ誘導体であり、本発明の化合物とは異なる。さらに、これらの特開平7-291859号公報、特開平7-291860号公報では、NF-kBなどの転写調節因子の阻害機構に関しては触れられていない。本発明者らは、本発明とは異なる化学構造を有するビスインドリールピラン誘導体のNF-kB磷酸化酵素阻害活性を見出し、すでに出願した(特願平7-125128)。

【0019】また、一般式(1)で示される化合物のうち一部のものについては、特開昭57-156463号公報、特開昭57-200366号公報、特開昭58-121278号公報、特開昭58-121279号公報、特開昭59-93054号公報、特開昭60-81168号公報、特開昭61-152658号公報、特開昭61-227581号公報、特開平2-256617号公報、特開平4-264030号公報、特開平7-41424号公報に示されるように、血管平滑筋弛緩作用、血流増加作用、血圧降下作用、脳保護作用、気管支痙攣抑制作用、気管支収縮抑制作用、活性酸素産生抑制作用を示し、血管拡張剤、脳循環改善剤、狭心症治療剤、血圧降下剤、脳心血管系の血栓症の予防治療剤、脳機能改善剤、気管支平滑筋弛緩剤、マクロファージの活

性酸素産生抑制剤において有効な物質であることは既に公知である。しかし、一般式(1)で示される化合物が有する、NF-κB活性化抑制作用に基づく炎症性サイトカイン産生抑制効果および炎症性細胞接着分子発現抑制効果は知られていなかった。

【0020】

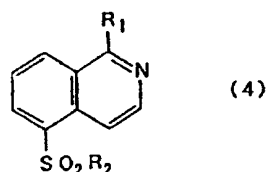
【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記観点からなされたものであり、NF-κBの活性化を阻害することに基づく、炎症性サイトカインの産生異常によって引き起こされる疾患、さらに、炎症性細胞接着分子発現異常による疾患等の予防治療剤の開発を最終的な目的とし、そのためにNF-κB磷酸化酵素阻害剤を提供することである。

【0021】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記NF-κB磷酸化酵素阻害物質に関し、鋭意検索を行ったところ、一般式(1)で示される化合物にNF-κB磷酸化酵素を強力に阻害する活性が存在することを見出し、本発明を完成した。

【0022】すなわち、本発明は、一般式(1)

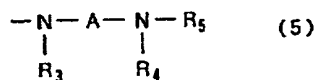
【化4】



(式中、R₁は水素、塩素または水酸基を表し、R₂が水素のとき、R₂は式(2)

【0023】

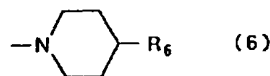
【化5】



(式中、Aは無置換もしくは炭素に結合する水素が炭素数1ないし4個のアルキル基で置換されている炭素数2ないし4個のアルキレン基、R₃、R₄は互いに独立して水素または炭素数1ないし4個の直鎖または枝分かれを有するアルキル基、R₅は水素、炭素数1ないし6個からなる直鎖または枝分かれを有するアルキル基、アミジノ基、カルバモイル基、シクロヘキシル基、あるいはR₃、R₄は直接結合して無置換もしくは炭素数1ないし4個のアルキル基で置換されている炭素数4個以下のアルキレン基、あるいはR₃、R₄は直接結合し隣接する窒素原子とともに複素環を形成する基を表す。)で示される化合物、または式(3)

【0024】

【化6】



(式中、R₆は水酸基またはアミノ基を表す。)で示される化合物を表し、R₁が塩素または水酸基のとき、R₂は式(2)で示される化合物のうち、Aはエチレン基、R₃、R₄は互いに結合したトリメチレン基、R₅は水素原子の場合を表す。)で示される置換されたイソキノリン誘導体またはその酸付加塩を有効成分とするNF-κB磷酸化酵素阻害剤である。

【0025】そして、上記一般式(1)で示される置換されたイソキノリン誘導体またはその酸付加塩のうち、R₁が水素のときのR₁が、式(2)において、Aは無置換の炭素数2ないし4個のアルキレン基、R₂は水素、R₃は水素またはメチル基、R₄は水素、メチル基、アミジノ基、カルバモイル基またはシクロヘキシル基、あるいはR₃、R₄は直接結合して無置換のエチレン基、あるいはR₃、R₄は直接結合し隣接する窒素原子とともに6員環複素飽和単環を形成する基を表す場合の化合物であるのが、最も好ましいNF-κB磷酸化酵素阻害剤である。また、本発明は、上記一般式(1)で示される置換されたイソキノリン誘導体またはその酸付加塩を有効成分とするNF-κB活性化抑制剤、炎症性サイトカイン産生抑制剤、炎症性細胞接着分子発現抑制剤および慢性関節リウマチ治療剤である。

【0026】本発明において、一般式(1)で示される具体的な化合物としては、例えば、次の化合物をあげることができる。

- (1) 1-(5-イソキノリンスルホニル)ホモピペラジン
- (2) N-(2-グアニジノエチル)-5-イソキノリンスルホンアミド
- (3) N-(2-アミノエチル)-5-イソキノリンスルホンアミド
- (4) N-[2-(N-メチルアミノ)エチル]-5-イソキノリンスルホンアミド
- (5) N-(3-アミノプロピル)-5-イソキノリンスルホンアミド
- (6) 1-(5-イソキノリンスルホニル)ピペラジン
- (7) 1-(1-ヒドロキシ-5-イソキノリンスルホニル)ホモピペラジン
- (8) N-[2-(N-シクロヘキシルアミノ)エチル]-5-イソキノリンスルホンアミド
- (9) 1-(5-イソキノリンスルホニル)-4-アミノピペラジン
- (10) N-[2-(N,N-ジメチルアミノ)エチル]-5-イソキノリンスルホンアミド
- (11) 1-カルバモイル-4-(5-イソキノリンスルホニル)ホモピペラジン
- (12) N-[2-(1-ピペリジル)エチル]-5-

イソキノリンスルホンアミド

(13) 1-(5-イソキノリンスルホニル)-4-メ
チルピペラジン

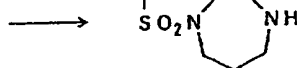
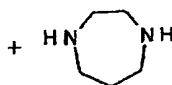
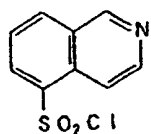
(14) 1-(5-イソキノリンスルホニル)-4-ヒ
ドロキシピペラジン

(15) 1-(1-クロロ-5-イソキノリンスルホニ
ル)ホモピペラジン

(16) N-(4-アミノピチル)-5-イソキノリン
スルホンアミド

(17) 1-(5-イソキノリンスルホニル)-2-メ
チルピペラジン

[0027] 本発明で使用する一般式(1)で示される*



[0029] このようにして得られた化合物を有効成分
として、NF-κB 磷酸化酵素阻害剤を製造することも
可能ではあるが、さらに、シリカゲルカラムや逆相系カ
ラムなどの公知の精製手段を用いて精製し、得られた化
合物を有効成分としてNF-κB 磷酸化酵素阻害剤とす
ることが好ましい。かくして得られる一般式(1)で示
される化合物が、NF-κB 磷酸化酵素を阻害すること
は、NF-κB 磷酸化酵素によるp50またはp65の
磷酸化度を測定して検出することができる。以下に、一
つの方法の例を示す。被験化合物をジメチルスルホキサ
イド(以下、DMSOと呼ぶ)に10mMになるように
溶解し、これを原液溶液として、蒸留水で希釈して40
0μMの溶液を調製する。比較のためDMSOを蒸留水
で同濃度になるように希釈したものを用意する。

[0030] 10mM MgCl₂、3mM 塩化マンガン
(MnCl₂)、5mM DTT、0.5mM ATP およ
び精製したNF-κB・NF-κB 磷酸化酵素複合体を
一定量含む20mMのN-2-ヒドロキシエチルピペ
ラジノ-N-2-エタンスルホン酸緩衝液(以下、HE
PESと呼ぶ)(pH7.8)に、3,000Ci/m
mol濃度の[γ-³²P]ATPを10μCi添加し、
最終的に10μlとする。30℃で30分間インキュベ
ートした後、SDSサンプルバッファー10μlを加え
て反応を停止させる。この液を100℃で5分間沸騰さ
せた後、10%アクリルアミドよりなるSDSゲル電気
泳動法により分画する。次に、オートラジオグラフィー
で、65kDaのNF-κB p65サブユニットの位置
を確認し、その部分をBAS-2000バイオ・イメー
ジングアナライザー(富士写真フイルム(株)製)を用
いて放射能を測定する。阻害化合物を添加しないDMS
O溶液の反応による放射能の量を対照に、その低下率に
より阻害活性を求めることができる。

* 化合物を得るには、公知の方法、例えば、Morikawa A.
ら J. Med. Chem., 32:46-50(1989)、特開昭57-156
463号公報、特開昭57-200366号公報、特開
昭58-1121278号公報、特開昭58-1121
279号公報、特開昭59-93054号公報、特開昭
60-81168号公報、特開昭61-152658号
公報、特開昭61-227581号公報等に記載されて
いる方法により合成することができる。代表例として、
5-イソキノリンスルホン酸クロリドとホモピペラジン
を反応させることにより合成する方法を下記に示す。

[0028]

[化7]

[0031] NF-κB 磷酸化酵素は、例えば、上記文
献に従って、種々の細胞・細胞株、組織等から抽出す
ることができる。特に、NF-κB 磷酸化酵素は、林らの
方法[Hayashi T.ら J. Biol. Chem., 268: 26790 (199
3)]に従ってヒトのT細胞からNF-κBとの複合体
として得ることができる。すなわち、ヘパリン添加ヒト
末梢血よりPBMC(単核球)画分を回収し、培地(R
PMI-1640)で洗浄の後、必要に応じて培養を行
い、その後、細胞を回収する。細胞をダウンスホモジナ
イザー等にて破砕し、10,000g、10分、4℃の
遠心により上清を回収する。この上清を100,000
g、30分の遠心により上清を回収し、S100画分と
する。S100画分を適当な緩衝液に対して透析し、陰
イオン交換、陽イオン交換、各種アフィニティー、ゲル
ろ過、密度勾配遠心等を用いて分離を行う。NF-κB
磷酸化酵素はNF-κBと複合体を形成していることか
ら、EMSA (Electrophoresis Mobility Shift Assa
y)により含まれている画分を決定することができる。
[0032] EMSAはSenらの方法[Sen, R.ら Ce
ll 46: 705-716 (1986)]を参考にして、以下のよう
に行うことができる。ただし、これは一例であり、こ
の方法にこだわらない。すなわち、10mM 塩化マグネ
シウム(MgCl₂)、5mM ジチオスレイトール(DTT
)、50mM トリス塩酸緩衝液(Tris-HCl)(pH
8.0)に、7.05pmol NF-κB コンセンサス
オリゴヌクレオチド(以下、NF-κB オリゴと呼ぶ)
(Promega社製)、10unit T4 ポリヌクレオチド
キナーゼ(NEW ENGLAND社製)、222TBq/mmol
濃度の[γ-³²P]ATPを1.85MBq添加し、
最終的に25μlとする。37℃で30分間インキュベ
ートした後、1mM EDTA、10mM Tris-H
Cl(pH8.0)を25μl加え、クイックスピンカ

ラムG-50〔ベーリンガー・マンハイム山之内(株)製〕を用い、1、100gで1分間遠心し、放射線標識の入ったNF-kBオリゴを分離する。100mM塩化ナトリウム(NaCl)、2mMEDTA、20mMDTT、10%グリセロール、0.24%ノニデットP-40(NP-40)、0.16%デオキシコレート(DOC)を含む2mMTriS-HCl(pH7.5) 5μlに、10μg/μl濃度のpoly(dI-dC) poly(dI-dC)〔シグマ(株)製〕を1μl加え、試料2μlを加える。さらに、上記で調製したNF-kBオリゴを1万cpmになるように添加し、最終的に10μlにする。室温で1時間インキュベートした後に、4%アクリルアミドゲルよりなるネイティブゲル電気泳動法により分離し、オートラジオグラフィーにてNF-kBオリゴと結合する画分を決定する。この画分がNF-kB・NF-kB磷酸化酵素複合体が含まれている画分である。

【0033】この画分を回収して酵素阻害剤の評価に供する。この画分に、NF-kB磷酸化酵素が存在していることは、磷酸化反応により約65kDaおよび約50kDaの位置に磷酸化されたバンドが検出されることより明らかである。一般式(1)で示される化合物は、常法により製剤化することができる。すなわち、一般式(1)で示される化合物またはその酸付加塩と、公知の医薬上許容される担体とを混合すればよい。上記の担体としては、例えば、ゼラチン：乳糖、グルコース等の糖類：コーン、小麦、米、とうもろこし澱粉等の澱粉類：ステアリン酸等の脂肪酸：ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム等の脂肪酸塩：タルク：植物油：ステアリンアルコール、ベンジルアルコール等のアルコール：ガム：ポリアルキレングリコール等があげられる。

【0034】これらのうち、液状担体の例としては、一般に水、生理食塩液、デキストロースまたは類似の糖溶液、エチレングリコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール等のグリコール類があげられる。本発明のNF-kB磷酸化酵素阻害剤がカプセル剤である場合には、通常ゼラチンを用いてカプセルを調製し使用することが望ましい。

【0035】投与方法は、経口投与や非経口投与があげられる。経口投与に適した剤形としては、錠剤、カプセル剤、粉剤、顆粒剤、液剤、エリキシル剤等があげられ、非経口投与に適した剤形としては、液剤が例示される。非経口的に筋肉内注射、静脈内注射、皮下注射で投与する場合、一般式(1)で示される化合物またはその酸付加塩は、溶液を等張するために、食塩またはグルコース等の他の溶質を添加した無菌溶液として使用される。

【0036】注射により投与する場合には、さらに、滅菌水、塩酸リドカイン溶液(筋肉内注射用)、生理食塩

液、ブドウ糖溶液、静脈内注射用溶液、電解質溶液(静脈内注射用)等で溶解することも好ましい。このように溶解した場合には、通常0.001~20重量%、好ましくは0.01~10重量%の有効成分を含むように調製されることがある。経口投与が錠剤、カプセル剤、粉剤、または顆粒剤である場合、0.01~100重量%、好ましくは1~40重量%の有効成分を含む例があげられる。経口投与の液剤の場合、0.01~20重量%の有効成分を含む懸濁液またはシロップが好ましい例としてあげられる。この場合、担体としては、香料、シロップ、製剤的ミセル体等の水様賦形剤をあげることができる。

【0037】本発明のNF-kB磷酸化酵素阻害剤の投与量は、患者の年齢、健康状態、体重、症状の程度、同時処置があるならばその種類、処置頻度、所望の効果の性質、あるいは投与経路や投与計画によっても決定されるが、一般には、非経口投与で0.01~100mq/kg・日、経口投与で0.02~400mq/kg・日があげられる。化合物によって投与量は若干異なるが、例えば、実施例に記載した化合物(1)の場合は、非経口投与では、好ましくは0.1mq/kg・日以上、さらに好ましくは1mq/kg・日以上、特に好ましくは2mq/kg・日以上があげられ、経口投与では、好ましくは0.5mq/kg・日以上、さらに好ましくは1または2mq/kg・日以上、特に好ましくは4mq/kg・日以上があげられる。

【0038】

【発明の実施の形態】次に、実施例により本発明をさらに詳細に述べるが、これに限定されるものではない。

(実施例1)まず、NF-kB・NF-kB磷酸化酵素複合体を調製し、NF-kB磷酸化酵素阻害活性を測定する方法の具体例を述べる。

(1) NF-kB・NF-kB磷酸化酵素複合体の調製
NF-kB・NF-kB磷酸化酵素複合体の調製は、林らの方法〔Hayashi T.ら J. Biol.Chem., 268: 26790 (1993)〕に準じて行った。すなわち、ヘパリン添加ヒト末梢血よりPBMC画分を回収し、RPMI-1640で洗浄の後、無血清培地AIM-V(GIBCO BR L製)に浮遊させた。OKT3固着化フラスコ〔ヤンセン協和(株)製〕中で3日間培養し、その後、AIM-V/0.2 units/ml インスリン/1%ヒト血清/700 Jurkat units/ml IL-2に浮遊させ、ガス透過性カルチャーバッグ(デュボン社製)中にて1週間培養を行った。培養終了時に遠心により細胞(約 5×10^8 cells)を回収し、NF-kB・NF-kB磷酸化酵素複合体調製のための材料とした。細胞を3倍量の低張緩衝液〔1.5mM MgCl₂, 5mM KCl, 10mM HEPES(pH 7.5), 4℃〕に浮遊させた後、10分間静置した。ダンスホモジナイザーに移して、10回のストロークで細胞を破碎し、10,000g、10分、4℃の遠心に より上清を回収した。この上清を100,000g、3

0分の遠心により上清を回収し、S100画分とした。

【0039】以下、NF- κ B・NF- κ B磷酸化酵素複合体の調製操作は4℃で実施した。S100画分を緩衝液D(20mM HEPES(pH7.9), 20% glycerol, 0.2mM EDTA, 0.5mM PMSF, 0.5mM DTT)+0.28MKClに対して透析した。DEAE-Sephrose(ファルマシア バイオテック(株)製)を詰めたカラム(1.6×10cm)を用意し、緩衝液D+0.28MKClで平衡化した。このカラムに透析したS100画分をアブライして、その非吸着画分を回収した。

【0040】その非吸着画分を緩衝液D+0.1MKClに対して透析し、次のカラムにアブライした。次のカラムとしては、緩衝液D+0.1MKClであらかじめ平衡化しておいたDEAE-Sephroseカラム(1.6×10cm)を用いた。上記の非吸着画分をこのカラムにアブライして、5カラム体積の緩衝液D+0.1MKClで洗浄後、10カラム体積で0.1~0.5MKClのグラジエント溶出を行った。NF- κ B・NF- κ B磷酸化酵素複合体が含まれている画分は、EMSA

(Electrophoresis Mobility Shift Assay)により決定した。【0041】EMSAはSenらの方法〔Sen, R.ら Cell 46: 705-716 (1986)〕を参考にして、以下のようにして行った。すなわち、10mMMgCl₂, 5mM DTT, 50mM Tris-HCl(pH8.0)に、7.05pmol NF- κ Bオリゴ(Promega社製)、10unit T4ポリヌクレオチドキナーゼ(NEW ENGLAND社製)、222TBq/mmol濃度の[γ -³²P]ATPを1.85MBq添加し、最終的に25μlとした。37℃で30分間インキュベートした後に、1mMEDTA, 10mM Tris-HCl(pH8.0)を25μl加え、クイックスピンカラムG-50〔ベリンガー・マンハイム山之内(株)製〕を用い、1.100gで1分間遠心し放射線標識の入ったNF- κ Bオリゴを分離した。

【0042】100mM NaCl, 2mMEDTA, 20mM DTT, 10%グリセロール, 0.24%NP-40, 0.16%DOCを含む2mM Tris-HCl(pH7.5)5μlに、10μg/μl濃度のpoly(dI-dC)poly(dI-dC)〔シグマ(株)製〕を1μl加え、DEAE-Sephroseカラム分離画分2μlを加えた。さらに上記で調製したNF- κ Bオリゴを1万cpmになるように添加し、最終的に10μlにした。室温で1時間インキュベートした後に、4%アクリルアミドゲルよりなるネイティブゲル電気泳動法により分離し、オートラジオグラフィにて、NF- κ Bオリゴと結合する画分を決定した。この画分がNF- κ B・NF- κ B磷酸化酵素複合体が含まれている画分である。NF- κ B・NF- κ B磷酸

化酵素複合体画分を回収し、緩衝液D+0.1MKClに対して透析した。

【0043】次に、Phosphocellulose P11〔ワットマン ペーパー(株)製〕(約6ml)を詰めたカラムを用意し、緩衝液D+0.1MKClで平衡化しておいた。上記の透析したNF- κ B・NF- κ B磷酸化酵素複合体画分をカラムにアブライし、非吸着画分を回収した。この画分を、あらかじめ緩衝液D+0.1MKClで平衡化しておいたHiTrap Heparin 1ml〔ファルマシア バイオテック(株)製〕にアブライし、非吸着画分を回収した。

【0044】HiTrap Heparin 非吸着画分をCentriprep-10〔グーレースジャパン(株)製〕で濃縮し、あらかじめ緩衝液D+0.1MKClで平衡化しておいたSuperdex 200HR 10/30〔ファルマシア バイオテック(株)製〕にアブライし、NF- κ B・NF- κ B磷酸化酵素複合体画分をEMSAにより決定した。その画分を回収して酵素阻害剤の評価に供した。この画分に、NF- κ B磷酸化酵素が存在していることは、磷酸化反応により約65kDaの位置に磷酸化されたバンドが検出できたことより明らかである。

【0045】(2)阻害剤の調製

一般式(1)で示される化合物を、DMSO(GIBCO BRL製)に10mMになるように溶解した。これを原液溶液として、蒸留水で希釈して400μMの溶液を調製した。比較のためDMSOを、蒸留水で同濃度になるように希釈した。

【0046】(3)阻害活性の測定方法

10mMMgCl₂, 3mMMnCl₂, 5mM DTT, 0.5mMATPおよび上記のNF- κ B・NF- κ B磷酸化酵素複合体を含む画分をタンパク質として0.35μg含む20mMのHEPES(pH7.8)に、被検化合物溶液2.5μl, 3000Ci/mmol濃度の[γ -³²P]ATPを10μCi添加し、最終的に10μlとした。30℃で30分間インキュベートした後、SDSサンブルバッファー10μlを加えて反応を停止させた。

【0047】次に、この液を100℃で5分間煮沸させた後、10%アクリルアミドよりなるSDSゲル電気泳動法により分画した。次に、オートラジオグラフィで、65kDaのNF- κ Bの位置を確認し、その部分を、BAS-2000バイオ・イメージングアナライザー〔富士写真フイルム(株)製〕を用いて、放射能を測定した。阻害化合物を添加しないDMSO溶液の反応による放射能の量を対照に、その低下率により阻害活性を求めた。NF- κ B磷酸化酵素阻害率を表1に示した。

【0048】

【表1】

NF- κ B 活性化酵素に対する化合物の阻害活性 (阻害率%)

	各化合物 [100 μ M]
化合物 (1)	93
化合物 (2)	92
化合物 (3)	91
化合物 (4)	89
化合物 (5)	73
化合物 (6)	64
化合物 (7)	62
化合物 (8)	62
化合物 (9)	60
化合物 (10)	50
化合物 (11)	40
化合物 (12)	34
化合物 (13)	29
化合物 (14)	26
化合物 (15)	21
化合物 (16)	18
化合物 (17)	75

【0049】(比較例1)以下の化合物に関しては、100 μ Mの最終濃度でNF- κ B 活性化酵素阻害が認められなかった。N-(6-アミノヘキシル)-5-イソキノリンスルホンアミド、N-[2-モノフロリノエチル]-6-イソキノリンスルホンアミド、N-[2-(N-2-ピリミジニルアミノ)エチル]-5-イソキノリンスルホンアミド、N-(2-[N-2-(2-イミダゾリル)]アミノエチル)-5-イソキノリンスルホンアミド。

【0050】(実施例2)

NF- κ B 活性化 (核内移行) 抑制作用。

(1) RA患者由来滑膜細胞の調製法

ヒトリウマチ患者の関節より、肥大化した滑膜細胞を手術によりかき取り、ビベッティングによりsingle cellにした後、37°C、5%CO₂、インキュベーター内で培養を行った。

【0051】(2) NF- κ Bの核移行の抑制評価方法
細胞の調製>滑膜細胞を8wellのLab-Tekチャンパー(Nunc社製)に、1500個/300 μ l/wellの細胞数になるようにまいた。37°C、5%CO₂、インキュベーター内で2日間培養後、薬剤を投与し培養を継続した。薬剤の調製は、DMSOに10mMの濃度になるように溶解し、終濃度で評価濃度になるように培養液に加えた。薬剤を投与後、2時間後に遺伝子工学的に大腸菌で産生させたTNFを1ng/mlの濃度になるように細胞に添加した。TNFで刺激した後、培

養を継続し、30分後にLab-Tekチャンパーを取り出し、核内移行の試験に用いた。

【0052】<核内移行試験>Lab-Tekチャンパーの容器をはずし、PBS(-)で洗浄後、PBS(-)に溶解した4.5%パラホルムアルデヒドで細胞を固定した。PBS(-)で洗浄後、0.5%Triton X-100で処理した。NF- κ B p65サブユニットに対する抗体p65抗体(C-20)(サンタクルツ社製)溶液を、1%BSA(牛血清アルブミン)溶液(0.1%NaN₃を含む)に1:100の割合で希釈し、1次抗体溶液を作製した。1次抗体溶液を固定化した細胞に与えて、37°Cで1時間反応させた。PBS(-)で洗浄後、0.05%Triton X-100溶液に浸けた。2次抗体溶液はanti-rabbit FITC conjugate(カッベル社製)溶液を、1%BSA(牛血清アルブミン)溶液(0.1%NaN₃を含む)に1:200の割合で希釈して作製した。2次抗体溶液を細胞に与えて、37°C30分間反応させた。

【0053】PBS(-)で洗浄後、風乾させグリセリンを垂らして、カバーガラスをして顕微鏡観察用のプレパラートとした。蛍光顕微鏡を用いて、FITCが結合したNF- κ B p65を検出した結果を以下に示した。TNF刺激により、NF- κ Bは核内に移行したが、化合物(1)を投与した細胞では、NF- κ Bが細胞質内に留まった。比較のために、DMSOのみを投与したも

の、およびTNF刺激を行わなかったものを作製した。DMSOのみを投与したものは、TNF刺激によりNF- κ Bが核内へ移行するのが認められた。一方、TNF刺激を行わなかったものは、NF- κ Bが細胞質に留まったままであった。この結果を図1、図2、および図3に示す。

【0054】(実施例3)

炎症性サイトカインの産生抑制評価

実施例2と同様にして、RA患者の滑膜細胞を、組織培養用48well plate (Falcon社製) に 3000個/300 μ l/wellの細胞数になるようにまいた。37℃、5%CO₂ インキュベーター内で2日間培養後、薬剤を投与し培養を継続した。薬剤の調製は、DMSOに10mMの濃度になるように溶解し、終濃度で評価濃度になるように培養液中に加えた。薬剤を投与2時間後に、遺伝子工学的に大腸菌で産生させたTNFを、1ng/mlの濃度になるように細胞に添加した。TNFで刺激した後、培養を継続し、16時間後に培養上清を回収した。

【0055】<サイトカイン測定>培養上清中のサイトカインは、IL-6をh-Interleukin-6 ELISA (ベーリン*

ヒト滑膜細胞に対する化合物のIL-6、IL-8産生阻害活性(阻害率%)

	IL-6	IL-8
化合物(1) [10 μ M]	51	45
化合物(1) [100 μ M]	79	78
化合物(7) [10 μ M]	52	30

【0059】(実施例4)

製剤例(錠剤)

一般式(1)で示される化合物のいずれか20mgをそれぞれが含んで成る錠剤を、下記の組成により慣用の方法で調製した。活性成分をコムギデンプンの一部、ラクトースおよびコロイド状シリカと混合して、その混合物を篩にかけた。残りのコムギデンプンの一部を湯浴上で5倍量の水でペースト状にし、その粉末混合物をそのペーストとややプラスチック状の塊ができるまでこねた。このプラスチック塊を約3mmのメッシュサイズを有する篩に通し、得られる乾燥顆粒を再び篩に通した。残り

* ガーマンハイム社)、また、IL-8をヒトインターロイキン-8 (IL-8) ELISAキット(東レ(株))を用いて測定した。

【0056】<細胞のバイアビリティ測定>培養上清回収後の細胞にMTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium·Br) 溶液を加えて、細胞のバイアビリティの測定を行った。培養上清回収後の細胞に、新鮮な培地を300 μ l添加、さらに、7.5mg/ml MTT溶液を30 μ l添加後、37℃、5%CO₂ インキュベーター内で4時間培養した。培養上清を除去後、フォルマザンを抽出し、540nm (参考波長690nm) 波長の吸光度でフォルマザン量を測定した。薬剤を添加せず、TNF刺激のない画分をバイアビリティ100%として、各画分のバイアビリティを算出した。

【0057】<サイトカイン産生の評価>サイトカイン産生の評価は、ELISAで測定した値を、その細胞のバイアビリティで割り返した値で評価した。その結果を、表2に示した。

【0058】

【表2】

30 のコムギ粉、タルクおよびステアリン酸マグネシウムを混ぜ合わせて、その混合物をそれぞれ1.45mgの重量および破断ノッチを有する錠剤となるように圧搾した。

【0060】(実施例5)

製剤例(無菌注射剤)

以下の成分を注射用蒸留水に溶解し、その後、注射用蒸留水を添加し、必要な最終含量とし、この溶液2mlをアンプルに密封し、加熱滅菌無菌注射剤を製造した(表3)。

【0061】

40 【表3】

製剤例(無菌注射液)

成分	量
10mg製剤	化合物(1) 塩化ナトリウム 蒸留水 10mg 16mg 適量 全量2mlとした
30mg製剤	化合物(1) 塩化ナトリウム 蒸留水 30mg 16mg 適量 全量2mlとした
60mg製剤	化合物(1) 塩化ナトリウム 蒸留水 60mg 16mg 適量 全量2mlとした

【0062】(実施例6)

N-(5-イソキノリンスルホニル)-4-アミノピペリジンモノ塩酸塩の合成

4-アミノピペリジン(2.0g、20mmol)の塩化メチレン溶液(100ml)に、5-イソキノリンスルホニルクロリド(5mmol)の塩化メチレン溶液(50ml)を室温下10分で滴下した。得られた溶液を2時間室温にて攪拌した後、水(50ml)を加えた。溶液を分液し、有機層を水(50ml)で洗浄した。有機層を減圧下濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて分離し、(クロロフォルム：メタノール=10:1)目的物の遊離体を(1.2g、4.1mmol)得た。遊離体に1.1倍等量の1N塩酸水溶液を加え、減圧下濃縮した。残さにメタノールを加え、再結晶して目的物0.94g(3.2mmol、収率64%)を得た。マスペクトル 理論値：327.0805質量単位；測定値：327.0812。

【0063】N-(5-イソキノリンスルホニル)-4-ヒドロキシピペリジンの合成

4-ヒドロキシピペリジン(2.0g、20mmol)の塩化メチレン溶液(100ml)に、5-イソキノリンスルホニルクロリド(5mmol)の塩化メチレン溶液(50ml)を室温下10分で滴下した。得られた溶液を2時間室温にて攪拌した後、水(50ml)を加えた。溶液を分液し、有機層を水(50ml)で洗浄した。有機層を減圧下濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて分離し、(クロロフォルム：メタノール=10:1)粗生成物を得た。これにメタノールを

加え、再結晶して目的物0.93g(4.2mmol、収率84%)を得た。マスペクトル 理論値：292.0878質量単位；測定値：292.0883。

【0064】4-カルバモイル-1-(5-イソキノリンスルホニル)ホモピペラジンの合成

N-(5-イソキノリンスルホニル)ホモピペラジン(2.9g、10mmol)に、酢酸30ml、水20mlを加え溶解した。得られた溶液に、イソシアン酸ナトリウム(1.3g、20mmol)を加え、40度に2時間加熱した。生じた沈殿を濾取し、メタノール/水にて再結晶して目的物1.1g(3.4mmol、34%)を得た。マスペクトル 理論値：334.1096質量単位；測定値：334.1105。

【0065】

【発明の効果】本発明のリン酸化酵素阻害剤は、NF- κ B 磷酸化酵素を阻害し、NF- κ Bを介した疾患に対する治療を行うのに有用である。すなわち、複数の炎症性サイトカイン遺伝子および炎症性細胞接着分子等の転写を抑制し、ステロイドが惹起するホルモン性の副作用がない、慢性関節リウマチ等や炎症全般の治療予防剤、また、臓器移植の際に用いる免疫抑制剤、腎炎などの臓器炎症等に対する治療予防剤、また、癌転移抑制剤、さらに、抗ウイルス剤として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】TNF刺激無しの細胞写真である。

【図2】TNF刺激有りの細胞写真である。

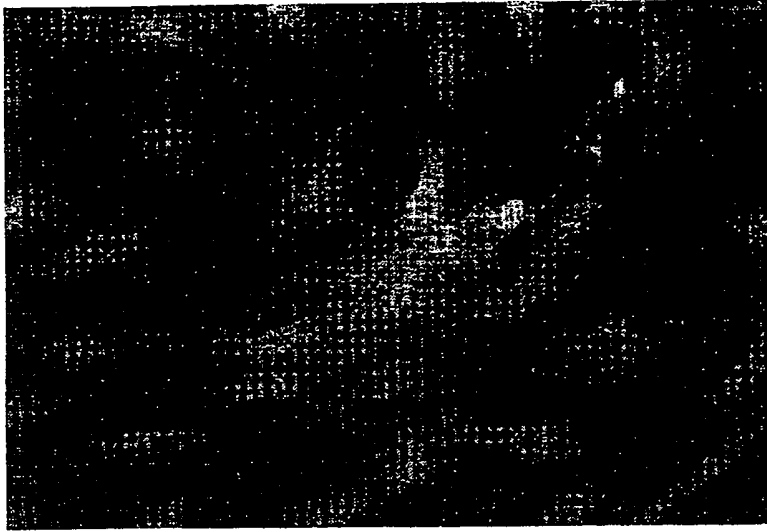
【図3】化合物(1)10 μ M処置後TNF刺激有りの細胞写真である。

(12)

特開平10-87491

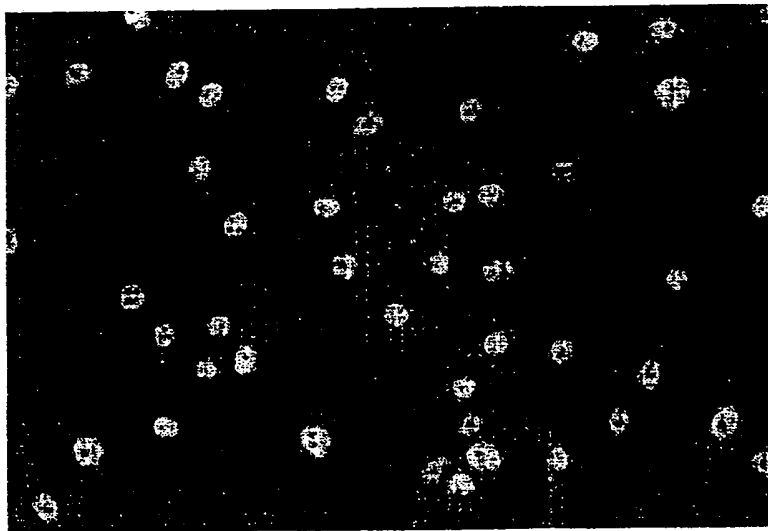
【図1】

図面代用写真



【図2】

図面代用写真



(13)

特開平10-87491

【図3】

図面代用写真



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 0 7 D 401/12	2 4 1	C 0 7 D 401/12	2 4 1

(72)発明者 森川 安理
静岡県富士市蛟島2番地の1 旭化成工業
株式会社内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.